

**TREATMENT FOR NERVOUS TROUBLE BY OLIGOPEPTIDE CONTAINING TRYPTOPHAN**

**Patent number:** JP62169730  
**Publication date:** 1987-07-25  
**Inventor:** KURAUSU ZONMAAMAIYAA; BURUKUHARUTO  
BAITORAA  
**Applicant:** FRESENIUS AG  
**Classification:**  
- International: **A61K38/04; A61K38/04; (IPC1-7): A61K37/02**  
- european: A61K38/04  
**Application number:** JP19870004217 19870113  
**Priority number(s):** DE19863601398 19860118

Also published as:

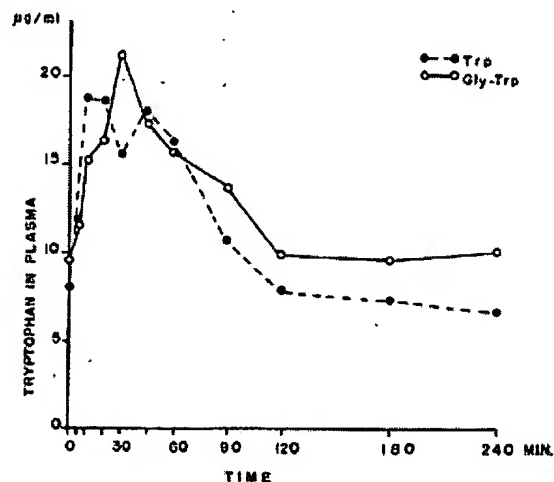
EP0234186 (A1)  
US4849408 (A1)  
DE3601398 (A1)  
EP0234186 (B1)

Report a data error here

Abstract not available for JP62169730

Abstract of corresponding document: **US4849408**

The use of tryptophan containing oligopeptides for the treatment of cerebral disturbances in particular sleeplessness and depression is disclosed. The use of glycyl tryptophan, if desired, in combination with tryptophan itself, is especially preferred.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭62-169730

⑬ Int. Cl. 4

A 61 K 37/02

識別記号

A A B

庁内整理番号

7138-4C

⑭ 公開 昭和62年(1987)7月25日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全10頁)

⑮ 発明の名称 トリプトファンを含有するオリゴペプチドを用いる神経障害の治療方法

⑯ 特 願 昭62-4217

⑰ 出 願 昭62(1987)1月13日

優先権主張 ⑱ 1986年1月18日 ⑲ 西ドイツ (D E) ⑳ P3601398.6

⑳ 発 明 者 クラウス・ゾンマー マ イヤー ドイツ連邦共和国, 6365 ロスバツハ, カベルスブルクシ  
㉑ 発 明 者 ブルクハルト・バ이트 ラー ドイツ連邦共和国, 6365 ロスバツハ 1, フリードリヒ  
㉒ 出 願 人 フレセニウス・アーゲ ー ドイツ連邦共和国, 6380 バート・ホンブルク, ゲルツケ  
㉓ 代 理 人 弁理士 鈴江 武彦 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

トリプトファンを含有するオリゴペプチドを用いる神経障害の治療方法

2. 特許請求の範囲

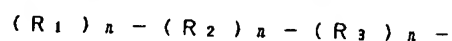
(1) 2ないし10のアミノ酸からなり、そのアミノ酸の少なくとも一つがトリプトファンであるオリゴペプチド、またはその薬剤的に受容できる塩基または酸との付加塩の薬理学的有効量を投与することによる神経障害の治療方法。

(2) 神経障害が不眠症である特許請求の範囲第1項記載の方法。

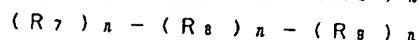
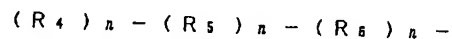
(3) 神経障害がうつ症である特許請求の範囲第1項記載の方法。

(4) オリゴペプチドがL-トリプトファンと組合わせて投与される特許請求の範囲第1項記載の方法。

(5) オリゴペプチドが、式、



- 1 -



[式中、 $R_1$  ないし  $R_9$  は、Trp、5-OH-Trp、Gly、Ala、Ser、Thr、Cys、Met、Asp、Asn、Glu、PhAla、His、Lys、Pro、Tyr、Val、Iso および Leu からなる群から選んだアミノ酸残基であり、 $n$  は1または0であり、 $R_1$  から  $R_9$  までの群は少なくともその群の一つが Trp または 5-OH-Trp であることを条件として同一または異なっている]

で表される特許請求の範囲第1項記載の方法。

(6) オリゴペプチドが1ないし5のアミノ酸単位からなる特許請求の範囲第2項記載の方法。

(7) オリゴペプチドが2つのアミノ酸単位を包含する特許請求の範囲第6項記載の方法。

(8) オリゴペプチドがグリシル-トリプトファンである特許請求の範囲第7項記載の方法。

(9) トリプトファンの使用を更に包含する特許請求の範囲第2項記載の方法。

- 2 -

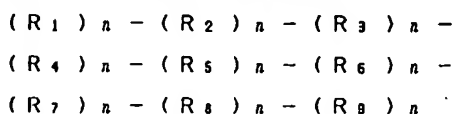
(10) 2ないし10のアミノ酸からなり、そのアミノ酸の少なくとも一つがトリプトファンであるオリゴペプチド、またはその薬剂的に受容できる塩基または酸との付加塩の薬理学的有効量と、薬剂的に受容できる担体とを包含する治療を必要とする神経障害の治療のための組成物。

(11) 神経障害が不眠症である特許請求の範囲第10項記載の組成物。

(12) 神経障害がうつ症である特許請求の範囲第10項記載の組成物。

(13) オリゴペプチド組成物が更にL-トリプトファンを包含する特許請求の範囲第10項記載の組成物。

(14) オリゴペプチドが、式、



[式中、 $R_1$ ないし $R_9$ は、Trp、5-OH-Trp、Gly、Ala、Ser、Thr、Cys、Met、Asp、Asn、Glu、

- 3 -

な知見から、睡眠経過の複雑性が確認され、また、睡眠を引起し、個々の睡眠相の秩序正しい経過を保証する生理学および生化学的機構がいかに複雑であるかが示された。

そのような機構には、大部分がアミノ酸から合成される異なる伝達物質いわゆる神経伝達物質を伴って種々の脳野が関与している。

そのような神経伝達物質として、ノルアドレナリンとドーパミン(チロシンから合成される)およびトリプトファンから合成されるセロトニンがよく知られている。

研究の結果、特定の神経伝達物質またはその前駆体の欠乏状態では、刺激伝達が妨げられ、その結果としてしばしば、例えば睡眠障害やうつ症などの精神疾患となることが示された。睡眠は中脳と変形脳の境界範囲のいわゆるラフェ(Raphe)系中のセロトニン効果ニューロンにより起こされる。脳内でのトリプトファンからのセロトニンの生合成が抑制され、その結果として不眠症が起こる。セロトニン欠乏は直接の置換えによつては

- 5 -

PhAla、His、Lys、Pro、Tyr、Val、IsoおよびLeuからなる群から選んだアミノ酸残基であり、 $n$ は1または0であり、 $R_1$ から $R_9$ までの群は少なくともその群の一つがTrpまたは5-OH-Trpであることを条件として同一または異なっている]

で表される特許請求の範囲第10項記載の組成物。

### 3. 発明の詳細な説明

[発明の技術的背景]

不眠症およびうつ症は日常的に多くの人がかかるよく知られた問題である。確実な作用薬は確かに豊富に存在するが、その様々な副作用のためにこれらの全てをためらいなく使用することはできない。時として不可欠である長期的な治療、とりわけベンゾジアゼピンを用いる治療では、習慣作用に注意することが必要である。しかし、バルビツール化合物や他の通常の睡眠薬もまた、依存を起し、自殺目的に利用される恐れがあり、更に、多数の副作用を有している。

最近睡眠の生理学について得られている基礎的

- 4 -

解消されない。というのは、望ましくない副作用と無関係のセロトニンは、それ自身いわゆる血液脳関門を通過できないからである。従つて、セロトニン効果ニューロン中で必須アミノ酸のトリプトファンから形成されなければならない。この合成は2段階で成され、まずトリプトファンヒドロキシラーゼを用いる水酸化によって5-ヒドロキシトリプトファンが形成され、これから芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼを用いる脱炭酸によって5-ヒドロキシトリプタミン、即ちセロトニンが形成される。

トリプトファン欠乏は中でも不眠症とうつ症を生じる。それで、トリプトファン欠乏とその結果は、血液脳関門を通過できる遊離形のトリプトファンの投与によって治療されてきた。そのような治療は、セロトニンなどの主要な伝達物質の不活性化を抑制する古典的な抗うつ薬と、活性化された網状神経組織を非特異的に弱める従来の催眠薬に比較して、一定の利点を有している。つまりこの治療の利点は、直接的であり、しかも副作用が

- 6 -

なく、依存または嗜癖を起こさない点である。また、自殺薬となる恐れもなく、更に、活性な向精神薬を用いる治療を必要とする重い障害の際にその薬量をトリプトファンの投与によって減少できる可能性がある（「ドイツの薬剤師

（Der Deutsche Apotheker）」、35巻、4号（1983年）、1～7頁を参照）。

遊離形でのみ血液脳関門を通過できるトリプトファンを用いるこの治療の欠点は、胃腸経路からのトリプトファンの吸収または吸収度が比較的低レベルであることと、組織膜を通るトリプトファンの輸送がかなり制限されていることである。そのため、トリプトファンは高い薬量と高い頻度で投与されなければならない。神経障害の治療に対しては、セロトニン濃度が脳内では高く、血中では低く保たれることが重要である。というのは、そうでなければ血中の高セロトニン濃度が抹消での障害を起こすからである。

また、セロトニンまたはトリプトファンの代わりに、セロトニン前駆体 5-ヒドロキシトリプ

- 7 -

って、本発明の課題は、従来の薬物の欠点を持たず、デカルボキシラーゼ阻害剤の使用を必要とせず、かつ、毒性でなく、実質的に副作用を持たず、依存または嗜癖を招かず、自殺に使用される恐れがなく、更に身体から良好に吸収される、即ちより少ない量の使用を可能にし、組織膜を通る良好な輸送を示す、不眠症およびうつ症などの神経障害の治療に対する新規な薬物を提供することである。

#### 〔発明の概要〕

結合したアミノ酸の少なくとも一つがトリプトファンまたはトリプトファンから誘導されたアミノ酸である一定のオリゴペプチドを神経障害、特に不眠症およびうつ症の治療に使用できること、および上記のオリゴペプチドまたはそのようなオリゴペプチドの混合物を含有する神経障害、特に不眠症およびうつ症の治療に対する薬剤が見出された。

そのような物質が、単独で投与された場合またはトリプトファンと組合せて投与された場合に効

- 9 -

トファンを用いる試みも既に行われている。この方法の問題点は、5-ヒドロキシトリプトファンがデカルボキシラーゼにより血中で既にセロトニンに変換され、そのために血中のセロトニン濃度が不都合に高められるということである。

その際には、吐き気や下痢などの望ましくない胃腸の副作用が観察される。そのような副作用を避けるためには、5-ヒドロキシトリプトファンを、パンセラジド（INN）即ち N-（DL-セリル）-N'-（2, 3, 4-トリヒドロキシ-ベンジル）-ヒドラジン、またはカルビドーバ（INN）即ち （-）-L-α-ヒドラジニル-3, 4-ジヒドロキシ-α-メチル-ハイドロ桂皮酸などのデカルボキシラーゼ阻害剤と共に投与しなければならない。しかし、これらのデカルボキシラーゼ阻害剤は、不都合でかつ場合によっては重大な副作用を生じるという欠点を有している。

それで、神経障害、特に不眠症とうつ症の治療に適した薬物が依然として必要とされている。従

- 8 -

果的であることが発見されたことは驚くべきことである。本発明のオリゴペプチドは、少なくとも一つがL-トリプトファンまたはその誘導体である全部で10を越えないアミノ酸、好ましくは9のアミノ酸の組合わせを包含する。

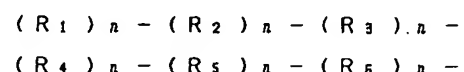
#### 〔好ましい具体的の説明〕

現在全ての天然のアミノ酸はL形で存在すると考えられている。従って本明細書中で、特に断わりのないものはL形で存在することが仮定されている。

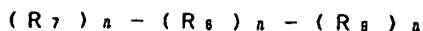
使用する名称はIUPAC-IUBの生化学命名委員会に従った（European J. Biochem., (1984), 138, 9-37）。

また特に断わらない限り、オリゴペプチド鎖の左端のアミノ酸が遊離のアミノ基を有し、右端のアミノ酸が遊離のカルボキシル基を有する。

本発明で好ましく使用できるオリゴペプチドは、式、



- 10 -



[式中、 $n$ は1または0であり、 $R_1$ ないし $R_9$ はアミノ酸である]

で表される。アミノ酸 $R_1 \sim R_9$ は、これらの群の少なくとも一つがトリプトファンまたはその誘導体、好ましくは5-ヒドロキシトリプトファンであることを条件として、同一であってもよく、また異なってもよい。ペプチド鎖中にトリプトファンおよび5-ヒドロキシトリプトファン以外に2ないし5のアミノ酸が存在することが特に好ましい。アミノ酸は、Gly、Ala、Ser、Thr、Cys、Met、Asp、Glu、Phe、His、Lys、Pro、Tyr、Val、IsoおよびLeuからなる群から選ぶことができ、Gly、Ala、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Asp、Glu、Gln、His、LysおよびProが好ましく、特にGlyが好ましい。

本発明は単一のオリゴペプチドの使用に制限されず、オリゴペプチド相互のまたはトリプトファン

- 11 -

5-OH-Trp、Ala-5-OH-Trp、Trp-Trp-Trp、Ala-Gly-Trp、Trp-Ala-Gly、Ala-Trp-Gly、Gly-Trp-AlaおよびSer-Trp-Ala-Trpがあり、特に本発明の目的に適するのは、Trp-Trp、Ala-Trp、Trp-Ala、Gly-Trp、Trp-Glyであり、中でもGly-Trpが最も好ましい。

本発明で使用されるオリゴペプチドは、例えばいわゆる遺伝子的方法も含めた通常の方法で製造できる。精製されたオリゴペプチドまたはその混合物の代わりに、これらのオリゴペプチドを含む加水分解物も使用できる。好ましい方法は、末端アミノ酸、好ましくはカルボキシル末端酸がアミノ部分で保護され、好ましくは不安定なアミノ部分を有する基質とカップリングされるメリフィールド(Merrifield)法である。末端アミノ基を保護基脱離し、望ましいオリゴペプチドが得られるまで合成を続け、開裂する。

- 13 -

ンまたはトリプトファン誘導体との混合物を使用できる。同様に、例えば塩酸または酢酸、好ましくは酢酸などの薬剤的に受容できる酸または塩基との付加塩も使用できる。

本発明に特に適するオリゴペプチドには、Trp-Trp、Ala-Trp、Trp-Ala、Gly-Trp、Trp-Gly、5-OH-Trp-Gly、5-OH-Trp-Ala、Gly-5-OH-Trp、Ala-5-OH-Trp、Trp-Trp-Trp、Ala-Gly-Trp、Trp-Ala-Gly、Ala-Trp-Gly、Gly-Trp-Ala、Ser-Trp-Ala-Trp、Ser-Trp-Ala-Gly、Ser-Trp-Ala-Trp-GlyおよびTrp-Ser-Ala-Gly-Trpがある。

好ましいペプチドとしては、Trp-Trp、Ala-Trp、Trp-Ala、Gly-Trp、Trp-Gly、5-OH-Trp-Gly、5-OH-Trp-Ala、Gly-

- 12 -

特に好ましいのは、トリプトファンとグリシルトリプトファンの混合物である。オリゴペプチドと共に使用してその塩を形成することができる薬剤的に受容できる酸および塩基は、これに限られるわけではないが、酢酸およびリンゴ酸を含む。リジン酸塩、アルギン酸塩およびオルニチン酸塩などのアミノ酸塩を使用できる。

トリプトファンと組合せて使用する場合は、オリゴペプチド/トリプトファン 重量/重量比は、1:10から10:1まで、好ましくは1:5から5:1まで、特に1:2から2:1までであり、最も好ましいのは1:1の比である。本発明のオリゴペプチドは、睡眠障害とうつ症の通常の治療薬に比較して大きな利点を有している。つまりこれらのオリゴペプチドは、毒性でなく、副作用がなく、依存または嗜癖を導かず、自殺薬として使用される可能性がなく、身体から容易に吸収され、優れた薬物動力学的挙動とトリプトファン自身より良好な生体膜を通る輸送とを示し、更に、デカルボキシルーゼ阻害剤の使用を不必要にする。従

- 14 -

って、これらの薬剤を比較的少量かつ低濃度で使用できる。驚くべきことに、トリプトファンと上に述べたオリゴペプチドとの混合物が、不眠症およびうつ症などの神経障害の治療に優れた結果を導くことが更に見出された。本発明の利点は実験結果によって確認された。

本発明で使用する組成物、すなわちオリゴペプチド、またはオリゴペプチドとトリプトファンまたはその誘導体との組合せは、経口投与に適するように処方することができる。そのためには、通常の希釈剤と混合し、それから、カプセル、懸濁液、乳剤、分散粉末、シロップおよびエリキシルなどの通常の投与形に形成する。

オリゴペプチドまたはそのトリプトファンとの組合せは、比較的に水に不溶であるが、十分な量の乳化剤または懸濁助剤が添加された場合には、高比率で水を含むソルビトール溶液またはグリセリン溶液中に懸濁することができる。また、必要な場合には、香料または着色料を添加することができる。

- 15 -

ル)を水(10 ml)中に懸濁し、トリエチルアミン(2.8 ml、20ミリモル)を加えた。その後、このようにして得た溶液をジオキサン(10 ml)を用いて希釈し、この混合物に氷浴上で(氷で冷却して)攪拌しながらジターシャリブチルジカーボネート(2.4 ml、10ミリモル)を加えた。それから、混合物を放置して室温にした。5時間後、トリエチルアミンの2度目の部分(1.4 ml、10ミリモル)とジターシャリブチルジカーボネート(1.2 ml、5ミリモル)を加えた。一方、攪拌は室温で一晩続けた。混合物をろ過し、減圧下で蒸発させた。残渣をクロロホルム(50 ml)に溶解し、溶液を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮して、油を得た。これをクロロホルム/アセトンから結晶させた。Boc-トリプトファンはトリエチルアミン硫酸塩として分離した。

#### 例 II

#### Boc-トリプトファンの支持相[SP]へのカップリング

DMF 50 ml中の3.11 g (7 mM)の

- 17 -

液体または固体の処方を経口投与のためにカプセルに詰めることができる。活性な成分を、ヒマワリ油、ダイズ油、トウモロコシ油またはタラ肝油などの動物油または植物油中に懸濁または溶解させることができる。例えば抗酸化剤などの通常の添加物を使用することができる。

カプセル中で使用される固体の処方は通常の担体物質と共に形成することができる。錠剤は常法に従って製造でき、炭酸マグネシウムまたはラクトースを不活性な希釈剤または担体として、トウモロコシデンプンまたはアルギン酸などの通常の崩壊剤、および/または、ステアリン酸マグネシウムなどの滑剤と共に使用することができる。

1~10 g/日、好ましくは1.5~3 g/日のトリプトファン含有量を(約60~70 kg体重のヒトに対して)投与することが好ましい。

#### 例 I

#### Boc-トリプトファンの合成

硫酸トリプトファン(2.28 g、10ミリモ

- 16 -

Boc-トリプトファンを1.89 g (14 mM)のHOBtと1.1 ml (7 mM)のDICと室温で30分間反応させ、このようにして得られた活性エステル溶液を5 gのジクロロメタン中のアミノエチル樹脂[SP]に加え、10%ジイソプロピルエチルアミンクロロホルム混合物中で脱プロトン化し、DMFを用いて2度洗浄した。反応を90分間で完了させ、ニンヒドリン反応により試験した。最後に、カップリングした樹脂をDMF、ジクロロメタン、再びDMFを用いて洗浄した。

#### 例 III

式、H-Asp<sub>1</sub>-Ser<sub>2</sub>-Tyr<sub>3</sub>-Arg<sub>4</sub>-Lys<sub>5</sub>-Trp<sub>6</sub>で表されるオリゴペプチドを、適当なBoc-Trp-[SP]から出発して、ベックマン(Beckman)990シンセサイザで次に述べる方法に従い段階的に合成した。

#### a) 脱ブロック化およびビルドアップ

脱ブロック化は次の計画Aに従って行った。

- 18 -

計画A		
試薬	混合時間 (分)	
1. TFA/トルエン 1:2*	2	
2. TFA/トルエン 1:2*	28	
3. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2	
4. MeOH	2	
5. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2と2	
6. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 中 DIEA (10%)	2と8	
7. MeOH	2	
8. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2	

カップリングは次の計画Bに従って行った。

計画B		
試薬	混合時間 (分)	
9A. DIC (2等量) + HOBt (4等量)	-	
10A. Bocアミノ酸 (2等量) #	60-90	
または		
9B. DIC (2等量) +	-	
10A. Bocアミノ酸 (4等量) @	60-90	
11A. DMF	2	
または		
11B. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2	
12. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2と2	

# 9Aと10Aの混合の30分前にDMF中に調製。

@ 9Bと10Aの混合の30分前にCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中に調製。

- 19 -

- 20 -

簡単には、樹脂1g当り1~2ミリモルのBoc-保護アミノ酸 (DMF中) を用いる。Boc-Ar<sub>g</sub> (Tos) がカップリングされる場合には、50% DMFと塩化メチレンの混合物が使用される。ベンジルエーテルが、SerおよびThyに対する水酸基側鎖保護基として使用される。2-クロロベンジロキシカルボキシル (2Cl-Cbz) がLys側鎖に対する保護基として使用される。TosはAr<sub>g</sub>のグアニジノ基の保護に使用され、GluおよびAsp側鎖カルボキシル基はOBzlまたはOChxを用いて保護される。Tyrのフェノール性水酸基は2,6-ジクロロベンジル (DCB) を用いて保護される。

次の式の化合物が得られた。

Boc-Asp<sub>1</sub> (X<sup>1</sup>) - Ser<sub>2</sub> (X<sup>2</sup>)  
- Tyr<sub>3</sub> (X<sup>3</sup>) - Ar<sub>g</sub><sub>4</sub> (X<sup>4</sup>)  
- Lys<sub>5</sub> (X<sup>5</sup>) - Trp - [SP]  
[式中、X<sup>1</sup> はO-シクロヘキシルエステル、  
X<sup>2</sup> はO-ベンジルエーテル、X<sup>3</sup> はO-2,

6-Cbzエーテル、X<sup>4</sup> はトシル、X<sup>5</sup> は2-Cbzである]

b) 開裂および保護基脱離

(実質的に、Tan et al., J. Amer. Chem. Soc. 105, 6442, (1983)の方法に従った。)

上記のようにして製造された保護ペプチドを出発物質として使用する。

保護ペプチドを2つの処理 (2+28分) を使用するHF処理に先立って50% TFA-トルエン (1:2 v/v) を用いて処理し、それからCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を用いて3度洗浄する。

HF試薬とペプチジル樹脂またはペプチドとの不完全な混合は、次の順の試薬の添加によって簡単に緩和できる。(a) ペプチドまたはペプチジル樹脂、(b) p-クレゾール、p-チオクレゾール、または両方、溶融形、暖かいペプチドによって注意深く樹脂の頂上に、(c) 冷却およびp-クレゾール混合物の固化後、磁気攪拌子、および(d) ジメチルスルフィド。

- 21 -

- 22 -

## a) 低濃度HF工程

試薬（ジメチルスルフィド、6.5 ml；p-クレゾール、0.75 ml；p-チオクレゾール、0.25 ml）、全量7.5 ml、およびペプチド樹脂（1.0 g）を反応容器中に置き、HFラインに連結した。容器を0.5時間（大容量の試薬に対してはより長い冷却時間）-78℃に冷却した。ラインを0.5分間簡単に真空にし、HFを真空にした反応容器中に10 mlのマークまで（または任意の望ましい容量）素早く蒸溜した。反応を氷浴によって0℃で素早く平衡させ、2時間勢いよく攪拌した（攪拌を定期的に調べる）。この点でのHF-ジメチルスルフィド-p-クレゾール混合物は、無色から明るい黄色であった。2時間後、混合物をまずアスピレータ（注意：ポンプ）を用いて、アスピレータに対する反応のバルブを部分的に開けて真空にした。試薬の大部分が除去された後、混合物を機械ポンプにより更に真空にし、明色の液体を得た（通常、約0.5 mlマーク）。

## b) 高濃度HF工程

- 23 -

合し、非極性付加物と非極性副生成物を、混入している痕跡量のHFと共に除く。粗ペプチドを10%の酢酸-水混合物を用いて樹脂粒子床から抽出し、凍結乾燥させた。

半プレパラティブ（preparative）またはプレパラティブ逆相クロマトグラフィーカラム（Vydac C18、10 x 250 mm、粒径5ミクロン、またはDynamax C18 マクロHPLCカラム 21、4 x 250 mm、粒径12ミクロン）を使用するHPLC法によって、粗ペプチドを精製した。

ポンプ：バックマン 114 M

溶媒デリバリーモジュール

検出器：バックマン 160 A 吸収検出器

勾配制御器：バックマン 420 勾配制御器

注入器：アルテックス（Altex） 210 A

検出波長：214 nm

溶出液：

A、0.1% TFA 水溶液（高純度）

B、0.1% TFA 水-アセトニトリル

- 25 -

前の低濃度工程からの蒸発させた反応容器を再び-78℃に冷却し、真空にし、再びHFを10 ml容量マークまで仕込んだ〔注意：最初の段階の後のHFおよびジメチルスルフィドの除去が不完全であった場合には、HFを再び5 mlまで仕込むことで、90%に満たない最終HF濃度となる。このような条件では、ベンズヒドリルアミン樹脂などのより酸耐性樹脂、またはトシルや2,6-ジクロロベンジルなどの多くの酸耐性保護基を有するペプチドは完全には保護基脱離されない。蒸発段階が完全であるかどうかについて疑問がある場合には、HFを全量7.5または10 mlまで入れて最終のHF濃度を確実に少なくとも90%容量%にしなければならない。95% HFと5% クレゾール+チオクレゾールの最終混合物は完全に満足できるものであることが見出された。〕それから、反応を0℃で平衡させ、45~60分間反応させた。その後、先に述べた方法に従ってHFを除いた。

開裂工程の後、残った固体を数回エーテルと混

- 24 -

## 3:7（容量比）混合溶液

## 例IV

クロロホルム性 シアノターシャリブチル エステル

クロロホルム性 シアノターシャリブチル エステルを、約-40℃でジクロロメタン（150 ml）中のシアノターシャリブタノール（10 g、100ミリモル）とピリジン（10 g、125ミリモル）を液体ホスゲン（-70℃、40 ml、600ミリモル）と反応させて、調製した。混合物を放置して室温にし、一晩攪拌した。その後、これを氷冷塩酸水溶液（1 N）を用いて抽出し、水水を用いて2度洗浄し、新鮮な無水硫酸ナトリウムと共に数回振ることによって速やかに乾燥させ、水相と硫酸ナトリウムを少量のジクロロメタンを用いて2度再抽出し、合わせた有機相を減圧下（20℃浴）で蒸発させ、生成物（17 g、100%収率）を得た。

## 例V

N-シアノターシャリブチロキシカルボニル-グ

- 26 -



リシン(CyOC-Gly-OH)

上述のようにして製造した粗エステルをテトラヒドロフラン(100ml)に取り、これをグリシン(15g、200ミリモル)の氷冷水酸化ナトリウム水溶液(1N、200ml)に約15分以上に亘って滴加した。室温で1時間攪拌した後、反応混合物のpHは約8であった。硫酸水溶液(2N)を添加してpHを約4~5にした。溶媒を減圧にして除き、全てが溶解するまで残渣を酢酸エチル/水混合物を用いて抽出した。水相を除き、pH1.5~2の酸性にし、更に酢酸エチルを用いて2度抽出した。合わせた有機抽出物を水を用いて抽出してサルフェートを除き、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で溶媒を除いた。残渣をエーテル/石油エーテルから再結晶して生成物(16.5g、82%)を得た。真空乾燥後、融点147~148.5℃。

例VIN-シアノターシャリブチロキシカルボニル-グリシル-レートリプトファン(CyOC-Gly-

- 27 -

分配、洗浄、酢酸エチル相の乾燥)。酢酸エチル相の蒸発の後、粘性のある油を定量的収率で得た(2.5g)。これを酢酸エチル/エーテルに溶解し、ジシクロヘキシルアミン(900mg、5ミリモル)を用いて処理し、ジシクロヘキシルアミン塩(不定形粉末)として生成物を得た(2.5g、85%)。

例VIIグリシル-レートリプトファン(H-Gly-Trp-OH)

上記に従って製造したCyOC-Gly-Trp-OH-DCHA塩(200mg、0.35ミリモル)を炭酸カルシウム(150mg、3ml水)の水溶液に取り、室温で6時間放置した。この放置後には、薄層クロマトグラフィー(溶出液、ブタノール/氷酢酸/水 3:1:1)はN-保護ペプチドの存在を示さなかった。薄黄色の溶液を、イオン交換器からろ過したドーエックス(Dowex)50(H<sup>+</sup>形)樹脂を加えることによってpH5にし、溶媒を減圧下で除いた。

- 29 -

-Trp-OH)

1g、5ミリモルのN-シアノターシャリブチロキシカルボニル-グリシン(CyOC-Gly-OH)(上記で製造)をテトラヒドロフラン(30ml)にとり、ジシクロヘキシルカルボジイミド(1.5g、5ミリモル)とN-ヒドロキシスクシンイミド(6mg、5ミリモル)と共に0℃で一晩攪拌した。このようにして製造したN、N'-ジシクロヘキシル尿素をろ過して除き、ろ過物を減圧下で蒸発させた。結晶性の残渣、CyOC-Gly-O-SUを更に精製または固定することなく利用した。これを、トリプトファン(1.02g、5ミリモル)とN-メチルホルムアミド(50ml)に取り、トリプトファンが溶解するまで(約3~4時間)0℃で攪拌した。反応混合物を冷蔵庫に一晩放置し、硫酸水素カリウム(1.4g、10ミリモル)の水(20ml)溶液を用いて処理し、減圧下で溶媒を除いた。残渣を定法に従って処理した(酢酸エチルと水への

- 28 -

残渣を少量のメタノール/エーテルを用いて処理した。溶媒を減圧下で除き、グリシル-レートリプトファン(85mg、90%)を得た。

上述の方法により、他のアミノ酸部分を使用し、これまでに述べたオリゴペプチドを製造することができる。

しかし、ペプチド鎖中に3またはそれ以上の単位を有するオリゴペプチドを製造する場合には、例Iないし例IIIに例示したようにメリフィールド法を利用するほうが都合がよい。この方法を特定のペプチドについて説明したが、上述した特別の方法を考慮することによって、この方法を上に開示した全てのオリゴペプチドの合成に同様に適用することができる。

- 30 -

例 VII錠剤処方A 群

Ala-Trp	1500部
(融点 293~294℃、 [α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> +15.5±0.5°)	
トウモロコシデンブ	60部
ポリビニルピロリドン	100部
ポリビニルポリピロリドン	30部
高分散二酸化ケイ素	2部
イソプロパノール	750部
水	210部

B 群

高分散二酸化ケイ素	2部
ステアリン酸マグネシウム	30部
タルク	30部
ポリビニルポリピロリドン	30部
トウモロコシデンブ	250部

- 31 -

(5N HCl 中)

水	300部
ソルビトール	700部

Gly-Trp を水とソルビットの混合物に懸濁した。必要ならば、通常量の香料と着色料を加えて、経口投与のための懸濁液を得る。

例 X I注射用組成物

Ala-Trp (50部) を水 (941部) (w/w) に取り、塩化ナトリウム (3部) を加えて溶液を等張にし、水酸化ナトリウムまたは塩酸を必要なだけ加えて pH 5.5~6 にし、得られた混合物を 0.1 ミクロンのメンブレンフィルターによりろ過して全粒子物質を除いた。ろ過物を注射アンプルに入れた。使用の前に、この製剤中の全成分を蒸気オートクレーブ処理した。

同様の方法で、Gly-Trp および他のこれまでに述べたオリゴペプチドを注射用に製造することができる。

例 X II

- 33 -

A 群の物質を混合し、顆粒に加工した。この顆粒を目の粗さが 1.5 mm のふるいにかけた。

これに B 群成分を加え、得られた混合物を圧縮して錠剤とした。

例 IX錠剤用組成物

Ala-Trp (1500部) とトウモロコシデンブ (100部) とアルギン酸 (10部) とを、トウモロコシデンブ水性ペースト (15%、全て重量に基づく) と混合し、加工して顆粒化した。この顆粒を目の粗さが 1.5 mm のふるいにかけ、約 60℃ で乾燥させた。この顆粒を再び同じ目の粗さのふるいにかけ、ふるいを通した物質をステアリン酸マグネシウム (10部) と混合した。このようにして得られた混合物を、経口投与のための錠剤の錠剤用組成物として使用した。

例 X水性懸濁液

Gly-Trp	600部
(融点 35℃、[α] <sub>D</sub> <sup>24</sup> +34°)	

- 32 -

錠剤処方 - 混合ペプチド

1500部の Ala-Trp の代わりに、Gly-Trp と Trp の等重量混合物の 1500部を使用する以外は例 I の方法に従って、経口投与のための錠剤に簡単に交換できる錠剤用組成物を得た。

例 X III

Ala-Trp の代わりに、Gly-Trp と Trp の 1:1 (重量比) 混合物の同様の量を用い、それ以外は例 II の方法に従った。経口投与のための錠剤に製造できる錠剤用組成物を得た。

例 X IV

50部の Ala-Trp の代わりに、Ala-Trp と Trp の 5:1 (重量比) 混合物の 60部を使用する以外は例 IV の方法に従って、注射用組成物を得た。Ala-Trp の代わりに、Gly-Trp または他の適当なオリゴペプチドを Trp と共に使用することができる。

例 X VI

600部の Gly-Trp の代わりに、Gly

- 34 -

-TrpとTrpの混合物(重量比 1:1)の600部を使用する以外は例Ⅱの方法に従って、経口投与のための同様な懸濁液を得た。

#### 例XVII

#### ラットを用いるTrpを対照としたGly-Trpの吸収実験

この実験にはスプラーク・ドーレイ(Sprague-Dawley)ラットを用いた。ラットを18時間絶食させ、経口胃管により試験物質を投与した。実験中は両方の物質を互いに試験した。適用量は実験動物の体重に従って調節した。ラットに、体重100g当り、13.3μモルのTrp(水4cc中)または6.7μモルのGly-Trp(水4cc中)を適用した。吸収試験のために、ラットの尾先端から50μℓの血液をヘパリン化したヘマトクリット毛細管へ採取した。血液採取は、適用前と、適用後5、10、20、30、45、60、90、120、180および240分に行った。

毛細管中の血液を利用することによって、ヘマ

トクリットの測定と、数回の血液採取による血液容量の変動を避けることが可能となった。

血液試験には血しょうを用いた。20μℓの血液を200μℓの0.4M過塩素酸を用いて処理し、その後この混合物を速やかに遠心分離した。それから、上清を分析した。その物質を、C18SIL-X10ゲルを含む一対のシリカゲルカラム(25×0.4+5cm×0.4)を通して溶出した。溶出液として、0.5M酢酸ナトリウム/0.5Mクエン酸/17%メタノール(pH4.2)を用いた。276/350nmでの蛍光測定により検出した。

この実験から得られた結果を添付した図面に示す。図中、nはラットの数である。

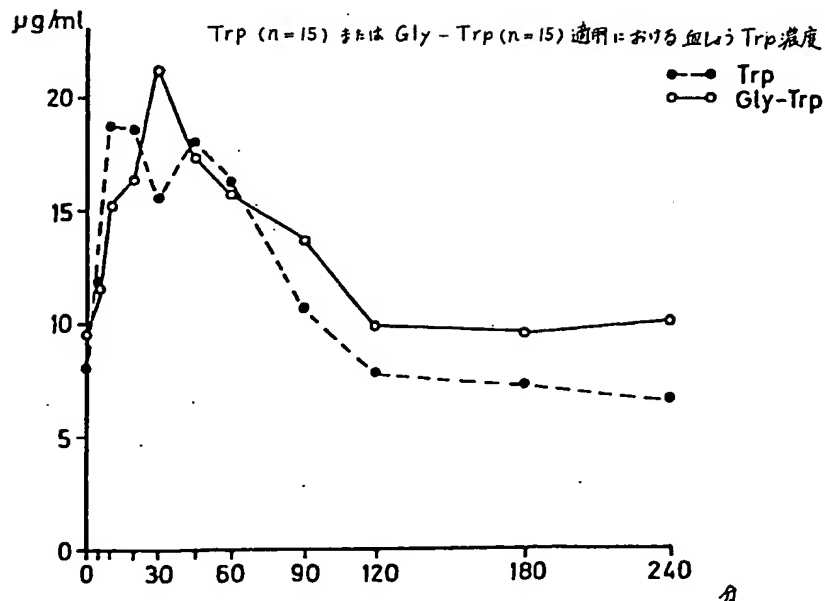
#### 4. 図面の簡単な説明

図はラットを用いたTrp-GlyとTrpの吸収実験の結果のグラフ図である。

出願人代理人 弁理士 鈴江武彦

- 35 -

- 36 -



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**